

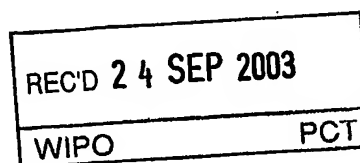
证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003 08 13

申 请 号： 03 1 53279.9

申 请 类 别： 发明

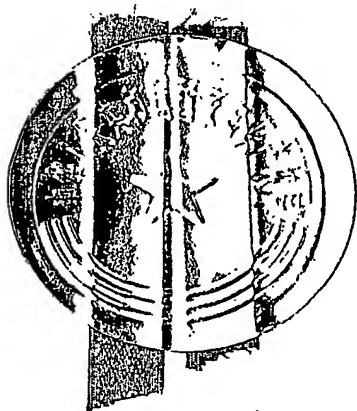


发明创造名称： 一种检测核酸分子的方法

申 请 人： 清华大学；北京博奥生物芯片有限责任公司

发明人或设计人：王栋；李刚；马雪梅；刘诚迅；周玉祥；程京

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2003 年 9 月 9 日

权 利 要 求 书

1、一种检测核酸分子的方法，包括以下步骤：

1) 制备细胞裂解物，所述制备细胞裂解物包括在裂解缓冲液中裂解生物样品中的细胞，并将待检测的靶标核酸分子从所述细胞内释放出来；

2) 所述步骤 1) 中的细胞裂解物不需任何核酸纯化步骤，直接同固定于固体基质表面的核酸探针在合适的条件下温浴；所述合适的条件是指所述靶标核酸分子能够同所述核酸探针杂交的条件，所述核酸探针含有同所述靶标核酸分子互补配对的序列；

3) 评估所述靶标核酸分子和所述核酸探针之间的杂交，进行所述靶标核酸分子的存在、不存在、和/或数量的检测。

2、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中，通过物理方法裂解所述裂解缓冲液中的细胞。

3、按照权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述物理方法为研磨、超声裂解、高温裂解和冷冻裂解方法。

4、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中，通过化学方法裂解所述裂解缓冲液中的细胞。

5、按照权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述化学方法为通过蛋白变性剂或者去污剂裂解细胞。

6、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中，通过生物学方法裂解所述裂解缓冲液中的细胞。

7、按照权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述生物学方法包括通过蛋白酶或者溶菌酶裂解细胞。

8、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中，细胞通过物理学方法、化学方法和生物学方法的任意组合进行裂解。

9、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，细胞裂解物在裂解缓冲液中同固定在固体基质上的探针进行温浴杂交。

10、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，在细胞裂解物同固定在固体基质上的探针杂交之前，在细胞裂解物中加入有助于杂交的物质。

11、按照权利要求 10 所述的方法，其特征在于：所述有助于杂交的物质为氯化钠、柠檬酸钠和 SDS。

12、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述生物样品选自非病毒生物样品、生物组织、原核细胞和真核细胞。

13、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述靶标核酸分子选自基因组 DNA、质粒、叶绿体 DNA、线粒体 DNA、信使 RNA、核糖体 RNA 和小核 RNA。

14、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述固体基质为尼龙膜、硝酸纤维素膜、硅、玻璃、陶瓷、金属和塑料中的一种或其任意组合。

15、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述固体基质含有多种核酸探针，所述多种核酸探针被固定在固体基质上并形成阵列。

16、按照权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述多种核酸探针具有不同的核酸序列。

17、按照权利要求 16 所述的方法，其特征在于：所述不同序列的探针数目为 2—100000 个。

18、按照权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述阵列的面积为 0.01 平方毫米-100 平方厘米。

19、按照权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述阵列为二维阵列、三维阵列或四维阵列。

20、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述固定于固体基质上的核酸探针包括单链寡核苷酸或双链 PCR 产物。

21、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述细胞裂解物包括去污剂、蛋白变性剂、核酸酶抑制剂、缓冲液和盐中的一种或其任意组合。

22、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述方法中，通过检测与靶标核酸分子结合的报告子来检测靶标核酸分子同核酸探针的杂交结果；所述报告子含有可检测的标记物，所述标记物为荧光素、放射性同位素、生物素、地高辛、金胶、磁珠、电化学标记物和化学发光标记物中的一种或其任意组合。

说明书

一种检测核酸分子的方法

技术领域

本发明涉及核酸检测领域中一种检测核酸分子的方法。

背景技术

在生物研究和临床药物研究中,核酸杂交反应是检测核酸序列的一种有力手段。要进行杂交,通常需要从细胞中分离或者纯化出核酸。核酸分离或者纯化步骤需要很多仪器(离心机、冰箱、电泳装置等),而且需要很长的时间才能完成。所需时间通常是几个小时甚至几天,非常不利于核酸分子的快速检测。虽然目前已经有一些公司生产大型的核酸抽提和纯化的自动化工作站,如 Biorobot 9600 和 Biorobot 9604 (Qiagen 公司),能够实现核酸分子和自动化抽提和纯化,但这些仪器非常昂贵,而且仍旧需要一个相对较长的时间来实现一个核酸样品的纯化和分离。

从 Fodor 等 1991 年在著名杂志 Science 上首先提出 DNA 芯片的概念后(Fodor et al., *Science* 251:767-773 (1991); Marshall et al. *Nat. Biotechnol.* 16:27-31 (1998)),近年来以 DNA 芯片为代表的生物芯片(biochip)技术得到了迅猛发展(Cheng et al., *Mol. Diagn.* 1:183-200 (1996)),目前已有多种不同功能的芯片问世,并且,这些芯片中有的已经在生命科学研究中开始发挥重要作用。

生物化学反应和分析通常包括三个步骤:样品制备、生化反应、结果检测和数据分析。科学家们已经做出很大的努力,尝试将生物化学分析的所有步骤在芯片上实现,即所谓的微分析系统或者芯片实验室。通过这样的微分析系统或者芯片实验室,人们已经可能将完成一个生化分析反应的所有步骤,从样品制备到分析结果,在一个封闭的系统内快速完成。

实现芯片实验室的瓶颈之一就是核酸的分离和纯化。该步骤不仅耗时长,而且很难在微小装置内实现。所以有必要克服这个困难。

1998 年 Jing Cheng 等人将细菌通过电子脉冲破胞,将破胞后溶液稀释 3 和 5 倍并加入蛋白酶 K,经过 50℃温育 20 分钟降解掉部分蛋白质后进行电子芯片杂交(Cheng et al. *Nature Biotechnology* 16:541-546 (1998))。Jing Cheng 等人首次实现了芯片实验室,将样品制备、生化反应和检测整合到了一起。虽然整个操作过程同传统生物分子检测方法相比已经简化,但破胞后的溶液依然需要经过酶反应去除蛋白质的后处理,不利于核酸的快速检测和实现装置自动化。

核酸分子的快速检测,无论对于生命科学的基础研究还是临床诊断都具有非常重要的意义。尤其是在临床传染病的诊断和治疗中,更快速的对病原微生物进行精确检

测，更有助于对病人进行及时、正确地诊断和治疗。以化脓及创伤感染标本的细菌学临床检验为例，现在医院中常用的诊断方法依次包括（血平皿）分离培养，纯培养和各种生化指标检测，不但步骤繁多，而且需要几天的时间（李影林主编，临床医学检验手册。吉林科学技术出版社，1987）。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种将非病毒生物样品裂解液直接用于核酸分子杂交的检测核酸分子的方法。

一种检测核酸分子的方法，包括以下步骤：

1) 制备细胞裂解物，所述制备细胞裂解物包括在裂解缓冲液中裂解生物样品中的细胞，并将待检测的靶标核酸分子从所述细胞内释放出来；

2) 所述步骤 1) 中的细胞裂解物不需任何核酸纯化步骤，直接同固定于固体基质表面的核酸探针在合适的条件下温浴；所述合适的条件是指所述靶标核酸分子能够同所述核酸探针杂交的条件，所述核酸探针含有同所述靶标核酸分子互补配对的序列；

3) 评估所述靶标核酸分子和所述核酸探针之间的杂交，进行所述靶标核酸分子的存在、不存在、和/或数量的检测。

本发明的方法可以检测任何生物样品内的靶标核酸分子。任何合适的生物样品，包括人的、动物的、环境有机物（土壤或者水等）的样品都可以通过本发明的方法进行分析。生物样品可以包括体液，例如尿液、血液、精液、脑脊液、脓液、羊水、眼泪；或者是半固体或者是体内排出的液体（fluid discharge），例如唾液、痰液、肺吸出物，阴道或者尿道流出物、粪便；或者固体组织样品，如活体组织或者绒毛膜标本。生物样品也可以包括咽部擦拭物、鼻腔擦拭物、口腔擦拭物、皮肤擦拭物和生殖器的擦拭物。在某些情况下，生物样品是非病毒生物有机体，如一块生物组织、一个真核细胞或者一个原核细胞。

在生物样品中含有待检测靶标核酸分子的细胞可以使用任何方法在裂解液中使其裂解，如物理方法、化学方法和生物方法。上述物理方法可为研磨、超声裂解、高温裂解和冷冻裂解方法。上述化学方法可为通过蛋白变性剂或者去污剂裂解细胞。上述生物学方法可包括通过蛋白酶或者溶菌酶裂解细胞。

制备好的细胞裂解物中可包含下述组分中的一种或其任意组合，该组分包括：蛋白变性剂、去污剂、缓冲液、核酸酶抑制剂和盐。

本发明中的靶标核酸分子可以选自基因组 DNA、质粒、叶绿体 DNA、线粒体 DNA、信使 RNA、核糖体 RNA 和小核 RNA。

在能够使靶标核酸分子同固定在固体基质表面的核酸探针杂交的条件下，根据上

述方法所制备的细胞裂解物不需任何核酸纯化或者提取步骤，可以同探针一起温浴进行杂交反应。例如，细胞裂解物可以在裂解缓冲液中同固定在固体基质表面的探针进行温浴杂交；也可在细胞裂解物同探针温浴杂交之前，将一些能够促进杂交的物质加到细胞裂解液中，如氯化钠、柠檬酸钠和 SDS。

杂交可以在本领域的任何合适技术下完成。这些技术可以改变杂交条件，以便提高或者降低杂交程度、杂交特异性、非特异杂交的背景程度等，例如改变杂交或者洗涤时的盐浓度或者温度。靶标核酸分子同探针之间的杂交可以在任何合适的杂交严谨度的条件下完成，包括高、中、低严谨度。通常，杂交是在高严谨度的条件下进行。

靶标核酸分子和探针之间的杂交条件可以是相同的，如分子信标 (molecular beacons) (Tyagi S. et al., *Nature Biotechnology*, 14:303-308 (1996); and U. S. Patent No. 6,150,097) 和杂交保护分析 (Gen-Probe, Inc) (U. S. Patent No. 6,004,745) 中所用的常规杂交条件，或者是不同的，如在不同纤维素膜和基于磁珠的杂交中所用的常规杂交条件。

在由高到低的杂交严谨度和洗涤条件下，靶标核酸分子可以通过与探针形成稳定杂合体的形式来检测靶标分子。通过杂交来检测靶标核酸序列的优点是通过探针的使用可以提高检测特异性。如果预期探针同靶标核酸分子完全匹配 (如 99% 或者更多)，可以使用高严谨度的条件进行杂交；如果预期探针同靶标核酸分子之间会有一些错配，例如检测样品中含有不同品系，则可以降低杂交严谨度。然而，也可以通过杂交条件的选择来降低或者去除非特异杂交。

在本发明所属的学科内，影响杂交和能够降低杂交背景的条件都是已知的 (Molecular Cloning A Laboratory Manual, second edition, J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，通常，低盐浓度和高杂交温度能够提高杂交严谨度。例如，一般情况下，高严谨度的杂交条件包括杂交液中大致含有 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS，杂交/洗涤温度大致为 65°C 。中严谨度的杂交条件包括杂交液中大致含有 $1-2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS，杂交/洗涤温度大致为 $50^{\circ}\text{C}-65^{\circ}\text{C}$ 。低严谨度的杂交条件包括杂交液中大致含有 $2 \times \text{SSC}$ ，杂交/洗涤温度大致为 $30^{\circ}\text{C}-50^{\circ}\text{C}$ 。

另一种杂交和洗涤方法是首先在低杂交严谨度的条件下进行杂交 ($5 \times \text{SSPE}$, 0.5% SDS)，然后通过含有 3 M 四甲基氯化铵 (TMAC) 的洗涤液进行高严谨度洗涤。TMAC 的作用是使 A-T 碱基对和 G-C 碱基对的结合力差距减少，这样就可以使给定杂交温度条件下的杂交效率同多聚核苷酸的长度有更直接的关系。通过 TMAC 的使用，使经过改变洗涤温度来达到所要求的严谨度是可能的 (Wood et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 82:1585-1588 (1985))。

杂交液中可以含有 25% 甲酰胺、5×SSC、5×Denhart' s 溶液、100 μg/ml 单链 DNA、5% 硫酸葡聚糖、或者其他对杂交有用的成分。

固定在固体基质表面的核酸探针可包含单链寡核苷酸或者双链 PCR 产物。这些寡核苷酸探针能够通过任何合适的方法制备。例如，可以通过化学方法合成 (Ausubel (Ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.11. Synthesis and purification of oligonucleotides, John Wiley & Sons, Inc. (2000))，也可以从自然资源中分离得到，也可以通过核酸重组或者以上几种方法的组合得到所需的探针。合成的寡核苷酸探针也可以通过 triester 方法 (Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 3:3185-3191 (1981)) 进行制备。另外，也可以通过自动合成仪进行合成，例如通过氰乙基氨基磷酸酯 (cyanoethyl phosphoramidite) 化学方法在 Applied Biosynthesis DNA 合成仪进行自动合成。探针最好通过化学方法进行合成。

用来进行探针合成所需的碱基可以从自然界中存在的核苷酸碱基选取如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶。也可以从非自然存在的、人工合成的核苷中进行选取，如 8-氧-鸟嘌呤 (8-oxo-guanine)、6-巯基-鸟嘌呤 (6-mercaptoguanine)、4-乙酰基胞嘧啶 (4-acetylcytidine)、5-羧基羟乙基-尿嘧啶 (5-(carboxyhydroxyethyl) uridine)、2-氧-甲基胞嘧啶 (2'-O-methylcytidine)、5-羧基甲基氨基-甲基-2-硫代胞嘧啶 (5-carboxymethylamino-methyl-2-thioridine)，5-羧基甲基氨基甲基-尿嘧啶 (5-carboxymethylaminomethyl uridine) 等。

同样，寡核苷酸的化学类似物，如核苷酸中的磷酸二酯键被修饰为甲基磷酸酯键 (methylphosphonate)、磷酸三酯键 (phosphotriester)、硫代磷酸酯键 (phosphorothioate)、二硫代磷酸酯键 (phosphorodithioate) 或 氨基磷酸酯键，也可以用来进行合成核苷酸探针。通过在寡核苷酸序列 3' 末端用耐核酸酶的连接键代替磷酸二酯键 (Shaw et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:747 (1991))，形成 3' 帽子结构，可以起到保护寡核苷酸序列防止降解的作用。氨基磷酸酯键 (Phosphoramidates)、巯基磷酸酯键 (phosphorothioates)、和甲基磷酸酯键 (methylphosphonate) 等都能起到保护寡聚核苷酸防止降解的作用。对磷酸二酯键的改造可以提高寡聚核苷酸序列的稳定性、亲和力和细胞穿透性 (Milligan et al., *J. Med. Chem.*, 36:1923 (1993))。很多不同的化学策略用新颖的连接键代替磷酸二酯键。这些磷酸二酯键的类似物包括巯基磷酸酯键 (phosphorothioate)，二巯基磷酸酯键 (phosphorodithioate)，甲基磷酸酯键 (methylphosphonate)，氨基

磷酸酯键 (phosphoramidate), 硼烷基磷酸酯键 (boranophosphate), 三磷酸酯键 (phosphotriester), 5'-硫醚 (5'-thioether), 碳酸酯 (carbonate), 硫酸酯 (sulfate), 磺酸酯 (sulfonate), 磺胺 (sulfonamide), 砒 (sulfone), 亚硫酸酯 (sulfite), 亚砒 (sulfoxide), 羟胺 (hydroxylamine) 等连接键。巯基磷酸酯键和甲基磷酸酯键改造的寡核苷酸序列尤其适合于自动寡核苷酸合成。本发明中的寡核苷酸序列也可以是“肽核酸” (peptide nucleic acid) (Milligan et al., J. Med. Chem., 36:1923 (1993))。寡核苷酸探针应该包括至少一段能同靶标 DNA 分子相匹配的序列。

杂交探针可以是任何合适的长度。该探针长度没有上限或者下限, 只要这个探针能同靶标核苷酸序列杂交并能有效的行使探针的功能 (方便检测) 即可。本发明中的探针可以短至 50 个核苷酸、40 个核苷酸、30 个核苷酸、20 个核苷酸、15 个核苷酸或者 10 个核苷酸, 甚至更短。同样, 该探针也可以长至 20 个核苷酸、40 个核苷酸、50 个核苷酸、60 个核苷酸、75 个核苷酸、100 个核苷酸或者 200 个核苷酸, 或者更长, 例如同靶标核酸序列同样长。通常, 探针至少含有 14 个核苷酸, 较合适的长度是最少 18 个, 更合适的长度是至少在 20 个核苷酸到 30 个核苷酸之间, 这些核苷酸序列同靶标寡核苷酸链匹配而且不含任何发夹二级结构。探针长度也可以至少 30 个核苷酸或者 50 个核苷酸。如果靶标核苷酸序列含有一段同探针完全匹配的序列, 则形成的双链结构甚至在严谨条件下都可以保持稳定, 这样探针的长度可以缩短到 10 到 30 个核苷酸范围内。如果预期在探针同靶标核苷酸序列之间存在部分错配, 例如探针同靶标核苷酸序列的一个可变区杂交, 或者同一个特定物种的所有品系杂交, 这些情况下, 探针的长度可以增长 (例如 15—40 碱基) 来平衡错配所带来的不稳定效应。

本发明中的探针可以固定在各种各样的固定基质上, 如尼龙膜、硝酸纤维素膜、硅、玻璃、陶瓷、金属和塑料中的一种或其任意组合。其他合适的固体基质也可以包括橡胶或多聚体表面。探针也可以固定在三维多空凝胶基质上, 如 Packard HydroGel chip (Broude et al., *Nucleic Acids Res.*, 29(19):E92 (2001))。

固体基质可以含有多多种核苷酸探针, 这些固定在固体基质上的核苷酸探针可以形成阵列。这些多种核苷酸探针可以有多个不同序列。不同探针的数目可以从 2 个到 100000 个。固体基质上的阵列面积可以从 0.01 平方毫米到 100 平方厘米。这些阵列可以是二维阵列、三维阵列或者四维阵列。对于基于阵列的分析, 这些探针可以通过合适的形式固定在固体基质上, 如生物芯片 (biochip)。这些固体基质可以是生物性质的、非生物性质的、有机的、无机的, 或者是以上形式的任意组合, 固体基质有

颗粒状、线状、沉淀状、胶状、片状、管状、球状、容器状、毛细管状、垫状、切片状、膜状、平版状、线状、载玻片状等各种形式。

含有一组探针的微阵列生物芯片可以通过多种已知方法进行制备，例如在美国专利U. S. Patent Nos. 5, 143, 854, 5, 384, 261 或 5, 561, 071中所描述的光引导方法；基于微球的方法，如在美国专利U. S. Patent No. 5, 541, 061；基于点样针的方法，如美国专利U. S. Patent No. 5, 288, 514和U. S. Patent No. 5, 556, 752，这种方法不仅适合于制备双链探针的微阵列，也可以制备含有发夹结构探针的微阵列。在美国专利U. S. Patent Nos. 5, 677, 195和5, 384, 261中所描述的流体槽方法，也能被用来制备拥有不同探针的微阵列生物芯片。在这种方法中，当探针通过流体槽运送到固体基质时，特定活化的固体基质区域通过机械或者物理方法同其他区域隔开。关于流体槽方法的更详细的描述可以从美国专利U. S. Patent No. 5, 556, 752, 中得到，该专利通过使用具有保护性的、湿润的包被便利剂，来提高液体沿着设计好的流路直接流动的能力。

点样方法 (spotting methods) 也能够用来制备固体表面固定有很多种探针的微阵列生物芯片。在这种方法中，体积微小的反应溶液直接被加到固体基质的选定区域。在某些操作步骤中，整个固体基质表面都可以覆盖或者通过其他方法包被上一层溶液。在某些特定的形式下，液体分配仪器从固体基质表面的一个区域移动到另一个区域，将合适体积和数量的探针或者其他成分加到特定区域。通常，液体分配仪器包括微升吸液器、纳升吸液器、喷墨打印机的储液腔和针头等装置，可以把含有探针的液体分配到固体基质表面。最好是通过一套机器人系统来精确控制液体分配仪器。液体分配仪器也可包括一系列的管或者含有多个井状盘 (well trays)、一个管汇 (manifold)、一个特异输送装置点阵，这样各种成分可以被同时分配到反应区域。点样方法在本学科内属于常规技术，例如在美国专利 U. S. Patent Nos. 5, 288, 514, 5, 312, 233 和 6, 024, 138 中有详细的描述。在一些情况下，流体槽方法和点样方法组合到一起也可以用来制备固体基质表面固定有探针的微阵列生物芯片。

用来固定探针的固体表面一般是平的，但也可以是其他形式。例如，固体基质表面可以含有突起或者凹陷，这些区域可以进行探针的合成和固定。固体基质可以选择具有光吸收特性的物质。例如，该固体基质可以是多聚 Langmuir Blodgett 膜、玻璃、或者是功能化的玻璃、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO₂、SiN₄、修饰硅，或者各种凝胶或者多聚体中的一种，例如 (多聚) 四氟乙烯、(多聚) 偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、或者以上各种材料的组合。其他合适的固体基质材料也可使用。

固体基质表面可以含有反应基团，包括羟基、氨基、羟氢氧基、巯基或者其他类

似物，这些反应基团有助于同结合在寡核苷酸或者核酸序列的反应基团结合。这些固体基质表面最好是光透明的，并且拥有表面硅羟基的很多功能，如在二氧化硅表面发现的那些功能。

可以通过物理或者化学的方法，如离子键、共价键或者其他已知的力将探针同固体基质结合在一起。核酸和寡聚核苷酸可以通过本领域各种已知的方法进行固定（例如 Dattagupta et al., *Analytical Biochemistry*, 177:85-89(1989); Saiki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6230-6234(1989); and Gravitt et al., *J. Clin. Micro.*, 36:3020-3027(1998)）。

探针分子可以通过连接臂分子同固体基质结合到一起，（如美国专利 U.S. Patent No. 5,556,752），连接臂分子的作用是给探针杂交所形成的双链区域提供一定的空间，这样有助于提高探针的杂交效率。一个连接臂分子一般长度为 6-50 个原子，并包含能同固体基质表面相结合的区域。连接臂或者探针可以通过碳碳键同固体基质表面相结合，如固体基质表面为（多聚）四氟乙烯；也可以以硅氧键结合，如固体基质为玻璃、二氧化硅。硅氧键可以通过固体基质表面和连接臂的三氯甲硅烷基（trichlorosilyl）或者三烷氧甲硅烷基（trialkoxysilyl）反应而形成。氨基烷基硅醇（Aminoalkylsilanes）和羟基烷基硅醇（hydroxyalkylsilanes），双（2-羟基乙烷基）-氨基丙基三乙氧基硅烷（bis(2-hydroxyethyl)-aminopropyltriethoxysilane），2-羟基乙烷基氨基丙基三乙氧基硅烷（2-hydroxyethylaminopropyltriethoxysilane），氨基丙基三乙氧基硅烷（aminopropyltriethoxysilane）或羟基丙基三乙氧基硅烷（hydroxypropyltriethoxysilane）等基团也是有用的固体基质表面结合基团。

连接臂也可包括一个延伸部分或者长链部分，该部分同探针的表面结合区域相连。例如，氨基（amines），羟基（hydroxyl），硫醇基（thiol），和羧基（carboxyl）基团适合连接延伸部分和探针的表面结合部分。连接臂的延伸部分可以是在合成工艺中处于惰性的任何一种分子。这些长链部分通常可以是含有 2-14 个单体，二元胺（diamines），二元酸（diacids），氨基酸（amino acids），肽（peptides）或者是这些分子的组合体的芳基乙炔（aryl acetylene），乙烯基乙二醇（ethylene glycol）的寡聚体。

连接臂的延伸部分可以是多聚核苷酸或者整个连接臂都是多聚核苷酸。连接臂的延伸部分也可以是聚乙二醇（polyethyleneglycols），多聚核苷酸（polynucleotides），烷撑（alkylene），多元醇（polyalcohol），聚酯（polyester），聚氨（polyamine），多聚磷酸二酯（polyphosphodiester），或者这几种成分的组合。另外，为将连接臂

应用到探针合成中，连接臂末端（相对于同固体基质结合端）应该有一个可同功能基团（例如氢氧基、氨基或者羧酸）相连接的保护基团。该末端在脱保护和偶联后，能够同一个多聚体或者探针共价结合。

本发明的方法可以通过一条捕获探针来分析一个样品，更适用于对样品进行高通量的分析。例如，很多样品可以同时被一条探针分析，或者一个样品同时被多条探针分析。最好为很多样品可以同时被很多探针分析。

靶标核酸分子同探针杂交后，其检测方法可以是该领域任何已知方法，例如对探针、第二探针或者报告子、靶标核酸分子进行标记或者对这几种分子的各种组合进行标记，这些检测方式都适合于本发明。另外，杂交结果也可以通过不需任何标记的质谱方法进行检测（例如 U. S. Patent No. 6, 300, 076）。

检测标记物是一组能够在杂交后被直接或者间接检测的物质，即检测标记物有可测量的物理特性（例如荧光或者光吸收等）或者是一个酶反应的参与者。当靶标核酸分子或者探针被直接标记时，可以通过检测杂交结果中的标记来评估杂交结果。当使用间接标记时，第二探针或者报告子被标记，可以通过检测第二探针或者报告子同原始杂交体之间的第二次杂交模式来评估杂交结果。

对探针或者核酸进行标记的方法很多。合适的标记物包括荧光素、载体、发光剂、放射性同位素、高电子密度物质、FRET (fluorescence resonance energy transfer)、酶和配体。比较有用的标记物是能够通过酶促反应活化的基团或者分子，例如酶 (Wisdom, *Clin. Chem.*, 22:1243 (1976))；酶底物 (British Pat. No. 1, 548, 741)；辅酶 (U. S. Patent Nos. 4, 230, 797 and 4, 238, 565)；酶抑制剂 (U. S. Patent No. 4, 134, 792)、荧光素 (Soini and Hemmila, *Clin. Chem.*, 25:353 (1979))；载体，包括藻胆蛋白；发光剂如化学发光剂和生物发光剂 (Gorus and Schram, *Clin. Chem.*, 25:512 (1979) and *ibid.*, 1531)；特异结合配体，例如蛋白结合配体、抗体；含有放射性同位素如 ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I , ^{14}C 等的残基。这些标记物可以根据其本身的物理特性（如荧光素、载体和放射性同位素）、反应或者结合特性（如抗体、酶、底物、辅酶和酶抑制剂）来进行检测。配体标记物本身也对固体基质结合寡聚核苷酸探针（捕获探针）有帮助。类似的标记物包括生物素（通过结合被标记的亲合素或者链亲合素进行检测）；酶，例如碱性磷酸酶或者过氧化物酶（通过加入酶底物产生有色反应底物来进行检测）。

放射性同位素标记的探针或者靶标核酸分子可以通过放射自显影技术进行检测。另外，标记有荧光素的探针或者靶标分子可以通过荧光计来检测。半抗原或配体标记的探针或靶标核酸分子，可以通过加入抗体或能与半抗原或蛋白结合的抗体生物素

(如亲合素)来检测。

另外, 探针或者靶标核酸分子也可以被一些检测时需要加入另外成分的标记物所标记。如果这样的标记物为酶, 则被标记的探针或者核酸分子需要置于合适的环境下进行催化反应。例如, 一个辅酶标记的核酸或者探针需要加入相关的酶和该酶的底物。所以, 如果该酶为磷酸酶, 则溶液中应该含有磷酸硝基苯 (nitrophenyl phosphate), 这样就可通过溶液颜色的变化来检测硝基苯的含量。如果该酶是一个 β -半乳糖苷酶, 溶液中应该含有 O-硝基-苯基-D-半乳糖-吡喃糖 o-nitro-phenyl-D-galacto-pyranoside, 该底物也能够释放硝基苯。后者的例子包括但不限于 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、木瓜蛋白酶和过氧化物酶。在原位杂交中, 底物的终产物最好是水溶性的。其他标记物还包括染色剂。

标记物可以直接同结合有 DNA 的配体连接, 这些标记物有吡啶染料、菲啉、吩噻、furocoumarins、]吩噻嗪和喹啉等, 可以通过化学键如共价键直接同配体结合。也可以将这些基团组装到微囊体或者脂质体中, 通过这些腔体再同配体相连, 达到间接连接的效果。将标记物同结合有 DNA 的配体连接到一起的方法如插入子方法 (intercalator) 在本领域都是常见的, 任何常见的方法都可以使用。比较有代表性的可插入物质包括单或者双叠氮氨基烷基乙啶 (mono-or bis-azido aminoalkyl methidium) 或者乙啶化合物 (ethidium compounds), 乙啶单叠氮乙啶双叠氮 (ethidium monoazide ethidium diazide), 二乙啶叠氮 (ethidium dimer azide) (Mitchell et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 104:4265 (1982)), 4-叠氮-7-氯喹啉 (4-azido-7-chloroquinoline), 2-叠氮苝 (2-azidofluorene), 4'-氨基甲基-4, 5'-白芷素 (4'-aminomethyl-4, 5'-dimethylangelicin), 4'-氨基甲基-三甲沙林 (4'-aminomethyl-4, 5', 8-三甲基-补骨脂素) (4'-aminomethyl-trioxsalen (4' aminomethyl-4, 5', 8-trimethyl-psoralen)), 3-羧基-5-或者 8-氨基-或者一羟基补骨脂素 (3-carboxy-5- or -8-amino- or -hydroxy-psoralen)。Forster 等人描述了一种可与特定核酸结合的叠氮化合物也可作为插入物质 (Forster et al., *Nucleic Acid Res.*, 13:745 (1985))。其他的光激活的插入子可以是同嘧啶残基形成 (2+2) 的循环加成物的呋喃香豆精。烷基化合物也可以被用来当作结合有 DNA 的配体, 包括, 例如 双-氯乙烷基胺 (bis-chloroethylamines) 和环氧化物 (epoxides) 或者吡丙啶 (aziridines), 例如, 黄曲霉毒素 (aflatoxins), 多环烃基环氧化物 (polycyclic hydrocarbon epoxides), 丝裂霉素 (mitomycin) 等。特别有用的光激活的插入子是叠氮插入子。这种物质在长波长的紫外光下或者可见光下, 能产生有

活性的氮宾，这些芳基叠氮化学物的氮宾比他们重排后的产物更倾向于插入反应。(White et al., *Meth. Enzymol.*, 46:644 (1977))。

探针也可以通过特殊的方式进行修饰，例如在反相点杂交中、探针与 BSA 结合或固定在磁珠上时，往往需要在探针末端加上 10—100 个 T 核苷酸。

当用间接检测方法检测杂交时，在探针同靶标核苷酸序列杂交中或者杂交后，需加入连接有可检测标记物的第二探针或者报告子。当加入第二探针或者报告子时，最好改变一些杂交条件。杂交完成后，没有杂交上的第二探针或者报告子可以同探针分离开，例如，当探针固定在固体基质上时，可以通过洗涤将未杂交的第二探针或者报告子洗掉。对于固体基质，可以通过检测该基质上的特定区域是否结合有标记物，来表明样品中的靶标核苷酸序列是否杂交到探针上。

连接有可检测标记物的第二探针或者报告子可以是一条特异探针。另外，连接有可检测标记物的第二探针或者报告子也可以是兼并引物，例如是整个基因组的混合物，如美国专利 U.S. Patent No. 5,348,855。当第二探针或者报告子中含有双链 DNA 时，标记物可以通过插入的方式同第二探针或者报告子连接到一起。能同 DNA 结合的更好的配体包括双—氯乙烷基胺 (bis-chloroethylamines) 和环氧化物 (epoxides) 或者吡丙啉 (aziridines)，例如，黄曲霉毒素 (aflatoxins)，多环烃基环氧化物 (polycyclic hydrocarbon epoxides)，丝裂霉素 (mitomycin) 等。

第二探针或者报告子也可以是一组随机的核苷酸探针序列。其长度要根据固定在固体基质上的探针的长度和组成或者靶标核苷酸序列来决定。这样的探针最好在其 3' 端或者 5' 结合光活化物质，另一端结合可检测物质，例如荧光素、酶、染色剂、发光剂或者其他已知的可检测物质。

用来制作含有标记的核酸序列的方法很多。例如，一个氨基取代的补骨脂素 (psoralen) 可以首先通过光化学方法同核酸分子连接到一起，这个连接产物有一个氨基基团，该基团能够结合标记物；补骨脂素 (psoralen) 也可以先同标记物连接例如酶，然后再同核酸分子结合。

结合有 DNA 的配体可以首先通过化学方法同标记物结合到一起，然后同核酸探针结合一起。例如，由于生物素有一个羧基，所以它能够同呋喃香豆素 (furocoumarin) 以氨基化合物或者酯的形式结合到一起，而没有干扰同呋喃香豆素 (furocoumarin) 的光化学反应和生物素的生物活性。氨基甲基白芷素 (Aminomethylangelicin)，补骨脂素 (psoralen) 和菲啉 (phenanthridium) 的各种衍生物也能够同标记物相结合 (Hertzberg et al, *J. Amer. Chem. Soc.*, 104:313 (1982))。另外，在合适的溶剂、成分和反应条件下，一些双功能物质如 1,4-丁二醇环氧丙脂醚 (1,4-butanediol

diglycidyl ether) 等可以直接将结合有 DNA 的配体同含有氨基和烷基的标记物连接到一起。某些双功能物质, 如戊二醛, 不适于用来处理 DNA, 因为它连接过程中可以改变 DNA 的某些特性, 所以会干扰结果的分析。一些常规的预防措施可以克服这些困难。

结合有 DNA 的配体可以通过一个连接臂同标记物结合到一起, 这个连接臂包括最长约 40 个原子, 最佳长度为 2 到 20 个原子, 包括但不限于碳原子、氧原子、氮原子和硫原子。这些连接臂也可以是由一些多功能基团组成, 这些多功能基团包括但不限于肽、碳氢化合物、聚乙二醇、聚醚、聚氨、聚亚胺和碳水化合物, 例如多聚赖氨酸或者其他寡肽、碳酰基二肽等其他类似基团。糖、聚乙烯氧化基团、甘油等其他类似基团都可以当作连接臂。连接臂可以直接同结合有核酸的配体和/或者同标记物相连, 或者连接反应可以包括一个两价的基团, 例如 1, 4-丁二醇环氧丙脂醚 (1,4-butanediol diglycidyl ether), 二异氰酸盐 (diisocyanate), 碳二亚胺 (carbodiimide), 乙二醛 (glyoxal), 戊二醛 (glutaraldehyde) 等类似物。

在对杂交结果进行间接检测中所用到的第二探针或者报告子, 也可以通过能量转移技术如“分子信标”技术 (Tyagi and Kramer, *Nature Biotech.*, 14:303-309 (1996) or U.S. Patent Nos. 5,119,801 and 5,312,728) 进行检测。本领域内的任何能量转移检测系统都可以用到本发明的方法中。例如, 可以将 AlphaScreen™ 系统用到本发明方法的检测中。AlphaScreen 技术是一种“放大发光接近均一分析技术 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)”技术。在 600 nm 的激光照射下, 供体微球中的光敏剂可以将环境中的氧变成单价氧。这些单价氧在衰减之前会散开大约 250 nm 的距离 (一个微球的直径)。如果受体微球距离供体微球足够近, 借助生物反应, 单价氧可以同受体微球中的发光基团反应, 这些发光基团会立即将能量转移至在同一个微球内的荧光受体, 这些荧光受体将发射波长改变为 520-620 nm。整个反应只有 0.3 秒的半衰期, 所以检测可以在短时间内完成。其他 FRET 中供体/受体对的例子包括荧光素 (供体) 和四甲基诺丹明 (受体), 其有效距离大约为 55 Å; IAEDANS (供体) 和荧光素 (受体), 其有效距离为 46 Å; 荧光素 (供体) 和 QSY-7 (受体), 其有效距离为 61 Å (分子探针公司)。

本发明的方法可以用来对靶标核酸分子进行定量检测。根据微阵列点上的第二探针或者报告子的多少可以计算样品中待检测的靶标核酸分子的多少。稀释成不同浓度的样品可以用来同含有已知靶标核酸分子的对照比较。在微阵列分析中, 把探针阵列同 X 光片或者磷成像仪 (phosphoimagers) 放在一起就可以检测哪条探针结合有标记物。荧光标记物可以通过 CCD 或者激光扫描进行检测。

靶标核酸分子同核酸探针的杂交结果，可以通过靶标核酸分子上结合的报告子的有无和多少进行评估。报告子上结合有可检测的标记物，这些标记物可以是以下物质的一种或其任意组合：荧光素、放射性同位素、生物素、地高辛、金胶、磁珠、电化学标记物和光化学标记物。

本发明的方法将非病毒生物样品裂解液直接用于核酸分子杂交，不需经过核酸分子抽提和纯化步骤，以达到缩短对核酸分子进行检测的时间。在本发明的方法中，生物样品首先放在裂解液中，通过物理、化学或者生物的方法使其裂解，在该裂解液中含有标记靶标核酸分子的物质；然后，细胞裂解物不经任何纯化同生物芯片杂交，来检测靶标核酸序列。

现在医院常用的检测方法需要大约 5-7 天，即使通过较新颖的常规生物芯片检测技术，包括核酸抽提，多重 PCR 扩增，芯片杂交等步骤也至少需要 4 小时。而通过本发明的方法，将细菌裂解液直接同生物芯片杂交，仅需 1.5 小时即可得到精确的实验结果。而且检测灵敏度也很高，对细菌的检测检测灵敏度能够达到 10^5 cfu/mL，非常有利于对病人进行快速诊断和及时治疗。而且本发明的方法步骤极其简单，只涉及非病毒生物样品裂解、核酸分子杂交两个主要步骤，成本低廉，非常容易实现小型化和自动化。本发明的方法可用于临床细菌的检测和分类、耐药性细菌检测、环境检测、法医检测和基因表达分析等领域。

附图说明

图 1 金黄色葡萄球菌的快速检测结果

具体实施方式

定义

除非另有定义，本发明中所出现的所有技术和科学短语，其含义同本发明所属领域内技术人员所理解的一样。如果本部分中提出的定义同该发明所引用的专利、申请、公布的申请和其他发表资料相反或者矛盾，则以本部分所提出的定义为准。

该发明所使用的“一个”表示“至少一个”或者“一个或者更多”。

该发明所使用的“核酸”表示任何形式的脱氧核糖核酸 (DNA) 和/或者核糖核酸 (RNA)，包括别名 (inter alia)，单链形式、双链形式、三链形式、线性和环状形式。它也包括多聚核苷酸、寡聚核苷酸、核酸杂合体 (chimeras of nucleic acids) 和核酸类似物。本发明中所描述的核酸包括含有腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶碱基的脱氧核糖核苷和核糖核苷，或者这些碱基的类似物或者衍生物组成的核酸。另外，其他一些没有常规的磷酸二酯骨架 (phosphodiester backbones) 也包含在内，如三磷酸酯 (phosphotriester)，多聚肽核酸 (polynucleopeptides)，甲基磷

酸酯 (methylphosphonate), 巯基磷酸酯 (phosphorothioate), 多聚核苷酸引物 (polynucleotides primers), 锁定核酸 (locked nucleic acid, LNA) 和其他类似物。

该发明所使用的“引物”是指能同一段靶标核苷酸序列杂交的一个寡聚核苷酸, 通常在扩增过程中引导核苷酸序列的合成。

该发明所使用的“探针”是指同一段靶标核苷酸序列杂交的一个寡聚核苷酸, 通常是用来检测该核苷酸序列。短语“靶标序列”或者“靶标核酸序列”是指该探针能够特异结合的核苷酸序列。探针与扩增反应中的引物不同, 探针不需要引导核酸序列的扩增。然而, 探针和引物在很多方面是结构相似或者完全一样。

该发明所使用的“样品”是指含有通过目前装置和/或方法来进行分析的待分析物质的任何东西。样品可能是生物样品, 如生物液体或者生物组织。生物液体的例子如尿液、血液、体液、血清、精液、痰液、粪、唾液、脑脊液、眼泪、鼻涕、羊水或者其他的类似物。生物组织是指细胞的集合体, 通常是通过特异的细胞间质形成人、动物、植物、细菌、真菌、或者病毒组织中的有一定结构的部分, 包括上皮组织、肌肉和神经组织。生物组织的例子也包括器官、肿瘤、淋巴结、血管和单个细胞。生物组织可以通过各种处理方法来获得细胞悬浮液。样品也可以是通过体外处理所获得的细胞混合物。样品也可以是人工培养的细胞悬浮液。这些生物样品可以是原始的、未经任何处理的样品, 也可以是经过各种各样的处理后的样品, 例如, 各种细胞分离方法 (磁细胞分类 magnetically activated cell sorting) 可以被用来进行从血液样品中分离或者富集细胞。本发明中所提到的样品也包括富集有靶标细胞的细胞样品。

该发明所使用的“未经核酸纯化”是指当生物样品在裂解液中被裂解后, 从细胞中释放出来的核酸分子在同固定在固体基质表面的探针杂交之前, 并没有被从裂解物中纯化、分离、提取出来。

该发明所使用的“匹配”是指两个核苷酸序列至少有 50% 的序列能够正确结合。更确切的讲, 两个核苷酸序列至少有 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100% 的序列能够正确结合到一起。“匹配”也指两个核酸序列能够在低、中、高严谨度条件下杂交到一起。

该发明所使用的“充分匹配”是指两个核苷酸序列至少有 90% 的序列能够正确结合到一起。更确切的讲, 两个核苷酸序列至少有 95%、96%、97%、98%、99%、100% 的序列能够正确结合到一起。另外, “充分匹配”也指两个核酸序列能够在高严格条件下杂交到一起。

该发明所使用的“两个完全匹配的核苷酸序列”是指这两条核苷酸链完全按照沃

特森-克瑞克 (watson-crick) 碱基配对法则 (DNA: DNA 双螺旋中的 A-T 和 C-G 碱基配对, DNA: RNA 双螺旋和 RNA: RNA 双螺旋中的 A-U 和 C-G 碱基配对) 结合, 这两条链都没有核苷酸的缺失或者添加。

该发明在决定错配百分度中所使用的“杂交严谨度”如下:

高严谨度: 0.1% × SSPE (或者 0.1 × SSC), 0.1% SDS, 65°C;

中严谨度: 0.2% × SSPE (或者 1.0 × SSC), 0.1% SDS, 50°C;

低严谨度: 1.0% × SSPE (或者 5.0 × SSC), 0.1% SDS, 50°C;

使用其他的缓冲液、盐和温度也能达到相同的严谨度。

该发明所使用的“基因”是指位于染色体特定部位的遗传单位, 也可以以等位基因的形式存在。即使出现断裂基因, 基因依然包含一段能产生单链多肽的 DNA 序列 (外显子)。

该发明所使用的“解链温度 (melting temperature, T_m)”是指核苷酸双链结构如 DNA: DNA、DNA: RNA、RNA: RNA、PNA: DNA 和 LNA: DNA 等变性温度的中点。

该发明所使用的“评估”包括定性和/或者定量的分析样品中待分析物质, 也包括可以获得对样品中待分析物质的存在含量的指数级、所占比例、所占百分比、图象或者其他有价值的提示。评估可以是直接也可以是间接的, 被检测的化学元素可以不是待分析物质本身, 例如可以是待检测物质的衍生物或者进一步的底物。

实施例 1、生物芯片上的细菌快速检测和鉴定

材料

(1) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (约 1.6×10^9 cfu/mL)

(2) 破胞液: 6% SDS, 0.1 M Tris, 0.05 M EDTA, 40 ng/μL 四种 Hex 荧光标记的报告探针

(3) 洗涤液: 2 × SSPE, 0.1% SDS

(4) 20 × SSPE: 3.6 M NaCl, 0.2 M 磷酸缓冲液, pH7.4, 20 mM EDTA

(5) 固定在生物芯片上的 4 种细菌特异捕获探针及其相应荧光标记的报告探针如表 1:

表 1 固定在生物芯片上的 4 种细菌特异捕获探针及其相应荧光标记的报告探针

菌种名称	捕获探针序列 5'-3'	报告探针序列 5'-3'
大肠杆菌	NH ₂ -T12-GTATTAAC TTTACTCCC	TTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTAC-Hex
金黄色葡萄球菌	NH ₂ -T12-AGCAAGCTTCTCGTCCG	TTCGCTCGAC TGCATGTAT TAGGC-Hex
铜绿假单胞菌	NH ₂ -T12-GCGCCCGTTTCCGGAC	GTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCC-Hex

具体检测和鉴定步骤如下:

(1) 将四种末端氨基标记的细菌特异捕获探针固定到醛基玻片上制成细菌检测生物芯片, 样品点之间的间距为 300 μm , 样品点直径为 150 μm 。

(2) 将金黄色葡萄球菌原始菌液 (1.6×10^9 cfu/mL) 细菌梯度稀释成 1.6×10^8 , 1.6×10^7 , 1.6×10^6 , 1.6×10^5 , 1.6×10^4 , 1.6×10^3 cfu/mL。

(3) 分别取 1 毫升浓度为 1.6×10^8 , 1.6×10^7 , 1.6×10^6 , 1.6×10^5 , 1.6×10^4 , 1.6×10^3 cfu/mL 的菌液, 10000 rpm 离心 5 分钟, 去上清。

(4) 分别将沉淀重悬于 20 μL 破胞液中, 枪头小心抽吸。

(5) 300 mV, 990 KHz 分别超声破胞 2 分钟 (裂解细菌, 释放细菌胞内的 16s rRNA; 荧光标记的报告探针同释放到溶液中的 16s rRNA 序列特异配对结合, 达到对待检测 16s rRNA 进行标记的目的)。

(6) 加入 2 μL 20 \times SSPE, 混匀 (使杂交液含有合适浓度的盐离子, 以促进核酸杂交)。

(7) 取 10 μL 加入 SSPE 的破胞液直接同细菌检测芯片杂交, 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 小时, 洗涤液洗涤 15 分钟, 离心, 甩干。

(8) genepix scanner 激光扫描, 并提取数据进行分析。

F 指每个探针的荧光信号。在这个实验中将将每条探针的背景值和标准差 (SD) 的 3 倍之和作为阳性信号的阈值 (threshold), 即阈值=背景值+3SD。只要一条条探针的荧光信号 (F) 大于此阈值, 即如果每条探针的荧光信号值 (F) 减去阈值大于零, 就可作为阳性信号。

各个细菌特异探针的杂交信号如图 1 所示, 表明当 1mL 菌液当中含有 1.6×10^8 , 1.6×10^7 , 1.6×10^6 , 1.6×10^5 个金黄色葡萄球菌时, 大肠杆菌, 铜绿假单孢菌和链球菌的探针荧光信号值与其阈值的差都小于零, 具体数值见表 1, 只有金黄色葡萄球菌特异探针的荧光信号与其阈值地差大于零, 具体数值见表 1。所以 1.6×10^5 cfu/mL 可以当作金黄色葡萄球菌的检测的底限。

表 1 信号值与阈值的差

	1. 6E+03	1. 6E+04	1. 6E+05	1. 6E+06	1. 6E+07	1. 6E+08
大肠杆菌	-93. 3424	-100. 931	-72. 18	-43. 6494	-77. 1986	-75. 9556
金葡	-107. 676	-89. 5976	33. 73486	738. 1839	4323. 385	13114. 04
绿脓	-119. 842	-116. 431	-80. 5966	-59. 8994	-96. 1153	-88. 2889
链球菌	-98. 2591	-81. 4309	-44. 7633	-19. 4828	-78. 4486	-69. 7056

说明书附图

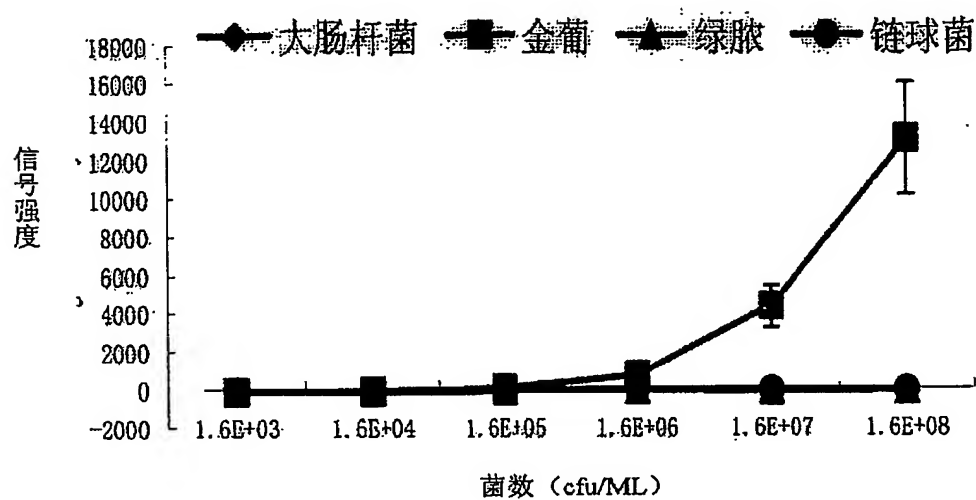


图 1